Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Transcutaneous carbon dioxide application suppresses bone destruction caused by breast cancer metastasis

Takemori, Toshiyuki

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2019-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第7338号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007338

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Transcutaneous carbon dioxide application suppresses bone destruction caused by breast cancer metastasis

炭酸ガス経皮吸収は乳癌骨転移による骨破壊を抑制する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒田　良祐　教授）

竹森　俊幸

要旨

はじめに

がん骨転移はすべてのがん種で起こる可能性があり，年々患者数は増加傾向にある．がん骨転移による骨関連事象が発生するとQOLを著しく低下させるため，新たな治療法が望まれているが，現在がん骨転移に対する根治的な治療法はない．がん骨転移部における骨破壊は，がん細胞が産生する溶骨性因子や破骨細胞分化因子 RANKL によって刺激された骨芽細胞が破骨細胞を分化・誘導することで生じる．また，がん骨転移部においては多くの悪性腫瘍と同様に腫瘍周囲が低酸素環境状態にあることが知られている．この低酸素環境は，腫瘍細胞の増殖能や転移・浸潤能の亢進，化学療法や放射線治療抵抗性に大きく寄与しており，骨破壊を増悪させる要因となっている．炭酸ガス経皮吸収は，炭酸ガスを経皮的に生体内へ吸収させて組織内の二酸化炭素分圧を上昇させ，局所でBohr効果を誘導し，投与局所を酸素化する方法である．我々はこれまでにこの炭酸ガス経皮吸収が悪性腫瘍組織内の低酸素環境を改善し，アポトーシスを亢進させることで抗腫瘍効果を示すことについて報告してきた．

そこで本研究では，炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善が，乳癌骨転移部における骨破壊に与える影響と治療効果について，ヒト乳癌細胞株を用いた in vitro および骨転移モデルマウスを用いた in vivo にて検討を行った．

方法

異なる酸素濃度培養下でのヒト乳癌細胞の RANKL および溶骨性因子の発現検討（in vitro）

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231を20%O_2で培養（Normoxic 群），2%O_2で培養（Hypoxic 群），2%O_2で培養した後に20%O_2で培養（Reoxic 群）の3つの異なる条件で計6日間培養を行った．培養後の RANKL および溶骨性因子（IL-1β, IL-6, IL-8, PTHrP）の発現変化についてリアルタイム PCR 法を用いて比較検討した．

ヒト乳癌細胞骨転移モデルマウスに対する炭酸ガス経皮吸収の in vivo での骨破壊抑制効果の検討

ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231を5週齢メスのヌードマウスの脛骨に移植し，乳癌骨転移モデルマウスを作製した．移植4週間後に μCT にて骨破壊を確認した後，100%炭酸ガス経皮投与を行うCO_2群と，空気を用いて同様の方法で治療する Control 群の2群に分け，1回10分間，週2回，2週間の治療を行った．腫瘍体積と体重変化について経時的な測定を行い，治療前後の移植部の骨量変化を μCT で比較検討した．治療終了後に脛骨を摘出し，HE 染色による組織学的評価を行い，さらに低酸素誘導因子 HIF-1α，破骨細胞分化因子 RANKL および溶骨性因子（IL-1β, IL-6, IL-8）の発現について免疫染色で評価した．破骨細胞活性については TRAP 染色を用いて比較検討した．

統計学的解析

2群間の比較にはt検定を用い，多群間の比較にはANOVA, post hoc検定を用いた．$p<0.05$を統計学的に有意とした．

結果

ヒト乳癌細胞において，低酸素環境は RANKL や溶骨性因子の発現を増加させ，酸素環境を改善することで発現が低下する

In vitroにおいて，低酸素濃度培養下（2%O_2）では RANKL, IL-8, PTHrP の有意な発現増強を認め，酸素環境を改善することでこれら因子の発現が低下することをリアルタイム PCR 法により確認した（Fig. 1）．

炭酸ガス経皮吸収は in vivo においてヒト乳癌細胞移植部の低酸素環境を改善し，骨破壊を抑制する

乳癌骨転移モデルマウスを用いた in vivo の検討において，CO_2群では乳癌細胞移植部の腫瘍増大が有意に抑制された．CO_2群と Control 群において有意な体重差は認めなかった（Fig. 2A, B, C）．μCTによる評価では，Control群と比較してCO_2群で骨破壊が抑制されており，骨量解析においても Control 群では治療前後で有意に骨量が低下していたが，CO_2群では有意差を認めなかった（Fig. 3A, 3B）．HE 染色による組織学的検討では，CO_2群において骨形態が維持されており，骨破壊が抑制されていた（Fig. 3C）．HIF-1αの免疫染色では，CO_2群で Control 群と比較して陽性細胞の減少を認め，乳癌細胞移植部での低酸素環境が炭酸ガス経皮吸収により改善されていることが示唆された（Fig. 4）．TRAP 染色においてもCO_2群で陽性細胞数の有意な減少をみとめ，炭酸ガス経皮吸収により破骨細胞活性が抑制されることが示唆された（Fig. 5）．RANKL や溶骨性因子の陽性細胞もCO_2群で Control 群と比較して減少を認めた（Fig. 6）．

以上の結果から，in vivo において炭酸ガス経皮吸収が乳癌骨転移部の酸素環境を改善させ，乳癌細胞から産生される RANKL や溶骨性因子の発現を低下させることで，骨転移部の骨破壊抑制効果を示すことが明らかとなった．

考察

がん骨転移部における骨破壊はがん細胞ではなく，破骨細胞が重要な役割を担っている．がん骨転移部では，がん細胞が溶骨性因子を発現することで骨芽細胞を刺激し，骨芽細胞からの RANKL 発現が増強する．また，がん細胞自体からも RANKL が発現されており，これらの RANKL が前駆破骨細胞に働くことにより破骨細胞が誘導・分化され，骨破壊が引き起こされると考えられている．また，がん骨転移部は多くの悪性腫瘍と同様に低酸素状態にあるが，この低酸素環境は細胞増殖能や治療抵抗性の要因となっており，さらに溶骨性因子の発現が増強するとの報告もある．

我々は，以前より炭酸ガス経皮吸収が悪性腫瘍組織内の低酸素を改善することで抗腫瘍効果を示すことを報告してきており，今回炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境改善に着目し，ヒト乳癌細胞による骨破壊に及ぼす影響について明らかとすべく，本研究を行った．

本研究の結果から，ヒト乳癌細胞から産生される RANKL や溶骨性因子の発現が低酸素環境で増加し，酸素環境を改善することで発現が低下することを確認した．さらに，炭酸ガス経皮吸収が明らかな体重減少なく，乳癌骨転移部の腫瘍増大を抑制し，骨量が維持されることを明らかとした．本研究で得られた結果から，低酸素環境ががん骨転移部の骨破壊に寄与している可能性が示唆され，炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善により，骨破壊抑制効果が生じることが明らかとなった．

本研究の limitation として，炭酸ガス経皮吸収が骨芽細胞に対する影響を検討していない点，乳癌細胞株でしか検討しておらず，他のがん細胞で検討していない点が挙げられる．さらなる検討が必要であるが，炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善が，がん骨転移部の骨破壊において新たな治療法となる可能性が示唆された．

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2831号	氏名	竹森 俊幸
論文題目 Title of Dissertation	Transcutaneous carbon dioxide application suppresses bone destruction caused by breast cancer metastasis 炭酸ガス経皮吸収は乳癌骨転移による骨破壊を抑制する		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 佐々木 [illegible] 副査 Vice-examiner 仁田 亮 副査 Vice-examiner 宮野 裕一		

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

がん骨転移患者数は年々増加傾向にあるが，根治的な治療はなく，新たな治療法が望まれている．がん骨転移部における骨破壊は，がん細胞が産生する溶骨性因子や RANKL によって刺激された骨芽細胞が破骨細胞を分化・誘導することで生じる．また，がん骨転移部では多くの悪性腫瘍と同様に局所低酸素環境状態にあり，低酸素環境が骨破壊を増悪させる一要因であると報告されている．炭酸ガス経皮吸収は炭酸ガスを経皮的に生体内へ吸収させ，生体内で Bohr 効果を生じ，局所を酸素化する方法である．研究者らは，以前からこの炭酸ガス経皮吸収が悪性腫瘍組織内の低酸素環境を改善し，アポトーシスを亢進させることで抗腫瘍効果を示すことについて報告してきた．

今回研究者らは，炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善が，乳癌骨転移部における骨破壊を抑制すると仮設し，本研究を行った．

対象と方法

In vitro において，ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231を，①20%O_2のみで培養(Normoxic 群)，2%O_2のみで培養(Hypoxic 群)，2%O_2で培養した後に20%O_2で培養(Reoxic 群)の3つの異なる条件で計6日間培養を行った．培養後の RANKL および溶骨性因子(IL-1β, IL-6, IL-8, PTHrP)の発現変化についてリアルタイム PCR 法を用いて評価した．

In vivo における検討として，ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231をヌードマウス脛骨に移植した乳癌骨転移モデルマウスに対し，移植4週間後にμCT にて骨破壊を確認したのち，CO_2群と Control 群の2群に分け，それぞれ100%炭酸ガス，空気を用いて経皮投与による治療を，1回10分間，週2回，2週間施行した．腫瘍体積と体重変化につき経時的な測定を行い，治療前後の移植部の骨量変化をμCT で比較検討した．治療終了後に脛骨を摘出し，HE 染色による組織学的評価を行い，さらに HIF-1α, RANKL, 溶骨性因子(IL-1β, IL-6, IL-8)の発現を免疫染色で評価した．破骨細胞活性については TRAP 染色を用いて比較検討した．

統計学的解析には，2群間の比較にはt検定を用い，多群間の比較には ANOVA, post hoc 検定を用いた．$p<0.05$を統計学的に有意とした．

結果

ヒト乳癌細胞において，低酸素環境は RANKL や溶骨性因子の発現を増加させ，酸素環境の改善でこれらの因子を低下させる

In vitro において，低酸素環境培養下では RANKL, IL-8, PTHrP 発現の有意な増強を認め，酸素環境を改善することで，これらの因子の発現の低下を認めた．

炭酸ガス経皮吸収は in vivo においてヒト乳癌細胞移植部の低酸素環境を改善し，骨破壊を抑制する

In vivo の検討において，CO_2群でヒト乳癌細胞骨転移モデルマウスの腫瘍増大が有意に抑制された．μCT による評価では Control 群と比較して CO_2群で，骨破壊が抑制されており，骨量も維持されていた．組織学的検討では，HE 染色で CO_2群において骨破壊が抑制され，骨形態が維持されていた．HIF-1α の免疫染色では，CO_2群で陽性細胞の低下を認め，乳癌細胞移植部での低酸素環境が炭酸ガ

ス経皮吸収により改善されていることが示唆された．TRAP 陽性細胞数は CO_2群で有意に少数であり，炭酸ガス経皮吸収により破骨細胞活性が抑制されることが示唆された．RANKL や溶骨性因子の免疫染色においては，CO_2群で陽性細胞の低下を認めた．

考察ならびに結論

本研究から，炭酸ガス経皮吸収がヒト乳癌細胞骨転移モデルマウスにおける骨破壊に対して，骨転移部の酸素環境を改善することにより，乳癌細胞から産生される RANKL や溶骨性因子の発現を低下させることで，骨転移部の骨破壊抑制効果を示すことを in vitro および in vivo において確認した．以上から，炭酸ガス経皮吸収が骨転移部の骨破壊において新たな治療法となる可能性が示唆された．

本研究は，乳癌骨転移部の骨破壊に対して，炭酸ガス経皮吸収が破骨細胞を抑制することで骨破壊抑制効果を示すことを初めて証明した報告である．乳癌骨転移に対して，炭酸ガス経皮吸収が新たな治療法となりうるとした点で，価値ある業績であると認める．よって本研究者は，博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める．